

* 研究简讯 *

通过红曲霉-土曲霉属间原生质体融合 提高 Monacolin K 产量

陈 芝 林 文 宇 萍 宋 渊*

中国农业大学生物学院微生物系, 北京 100094

摘要 为获得高产 Monacolin K 的红曲霉菌株, 将高产 Monacolin K 的土曲霉 *Aspergillus terreus* CA99 与低产 Monacolin K 的红曲霉 *Monascus anka* M-3 进行原生质体融合. 生长 24 h 的 *A. terreus* CA99 和 *M. anka* M-3 菌株用 0.5% 溶壁酶、0.3% 蜗牛酶和 0.3% 纤维素酶混合酶液分别在 34℃ 和 30℃ 下处理 5 h 和 3.5 h, 原生质体的形成率分别为 1.76×10^7 /mL 和 1.68×10^7 /mL. 两种原生质体分别置于 30W 的紫外灯下, 距离 30 cm 照射 3 min 灭活, 等浓度混合后用浓度为 30% 的 PEG 6000 融合 15 min. 再生平板上共选取 363 株融合子, 从中筛选得到多株 Monacolin K 产量高于出发菌株的高产融合子, 其中有 10 株产量的提高幅度超过 60%, 有 2 株融合子(F49 和 F104)产量提高了将近一倍, 分别为 460 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 457 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 对 F49 的发酵培养基进行优化, Monacolin K 发酵单位达到了 1216 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

关键词 Monacolin K 红曲霉(*Monascus anka*) 土曲霉(*Aspergillus terreus*) 原生质体融合 发酵

Monacolin K 是一种羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG CoA)还原酶抑制剂, 被用于治疗高胆固醇症^[1]. 高血脂症是造成心脑血管疾病的重要因素, Monacolin K 能阻止动脉硬化发展, 减少心肌梗塞等发病的危险^[2], 因此在临床治疗上具有重要意义. 生产 Monacolin K 的菌种主要有两类: 土曲霉和红曲霉^[2,3]. 红曲霉在中国已有数千年的应用历史, 被广泛地应用于食品着色及其医疗上. 红曲霉除可产生 Monacolin K 之外, 还可以产生红曲色素和橘霉素等多种活性物质^[4]. 将红曲霉添加到食品和饮料中, 开发成具有保健功能的食品和饮料正引起世界范围的关注^[5,6].

目前选育高产 Monacolin K 的红曲霉菌株大多采用诱变的方法, 诱变筛选存在着工作量大, 耗时久等不足之处. 原生质体融合技术是微生物育种中常用的技术, 在丝状真菌中有许多通过属内或属间融合获得优良性状杂交菌株的成功报道^[7-10]. 鉴于微生物来

源的降胆固醇药物——Monacolin K 良好的应用前景、红曲霉所具有的较高的药用价值和可直接食用性以及丝状真菌原生质体融合技术的成熟发展, 本研究将高产 Monacolin K 的土曲霉与低产 Monacolin K 的红曲霉进行原生质体融合, 以期获得高产 Monacolin K 的融合子, 为进一步研究和工业化生产打下基础. 本文研究了土曲霉和红曲霉融合子产生 Monacolin K 和红曲色素的能力. 据我们所知, 这也是首例利用属间原生质体融合提高 Monacolin K 产量的报道.

1 材料和方法

1.1 菌株及其孢子保存

土曲霉(*A. terreus*)CA99, 为 Monacolin K 高产菌株^[11]; 红曲霉(*M. anka*)M-3, 产红曲色素和 Monacolin K, 均为本室保存. 所有菌株均在产孢

2006-08-03 收稿, 2006-10-13 收修改稿

* 通信作者, E-mail: syuan@cau.edu.cn

固体培养基上进行传代。菌株在斜面上生长7d后收集孢子，储存在4℃用于接种。

1.2 培养基

产孢培养基：红曲霉(1L)：葡萄糖10g；蛋白胨5g；牛肉浸膏3g；NaCl5g；琼脂15—20g；pH7.0。土曲霉(1L)：葡萄糖4g；酵母提取物4g；麦芽提取物10g；琼脂20g；pH7.0。

菌丝生长培养基(1L)：葡萄糖100g；蛋白胨10g；KNO₃2g；NH₄H₂PO₄2g；MgSO₄·7H₂O0.5g；CaCl₂0.1g；pH6.8。

原生质体再生培养基(1L)：葡萄糖100g；蛋白胨10g；KNO₃2g；NH₄H₂PO₄2g；MgSO₄·7H₂O0.5g；CaCl₂0.1g；蔗糖200g；脱氧胆酸钠8g；琼脂20g；pH6.8。

种子培养基和发酵培养基(FM)：用于红曲霉 Monacolin K 和红曲色素的合成，其中种子培养基(1L)：葡萄糖10g；蛋白胨15g；NaNO₃2g；MgSO₄·7H₂O1g；pH6.8。发酵培养基(1L)：葡萄糖50g；酵母膏10g；番茄酱20g；CaCO₃1g。

1.3 原生质体融合

原生质体的制备：将红曲霉和土曲霉的孢子分别接入菌丝生长培养基，30℃振荡培养24h，用250目网筛收集菌体。按1mL/150mg湿菌体加入混合酶液(0.5%溶壁酶+0.3%蜗牛酶+0.3%纤维素酶)，缓慢振摇以分散菌丝体，在30℃作用3.5h(红曲霉)或34℃作用5h(土曲霉)，经4层无菌显微镜擦镜纸过滤，去除菌丝片段，2000r/min离心5min收集原生质体，用PBS缓冲液(0.7mol/L NaCl，由pH5.8的0.2mol/L H₃PO₄缓冲液配制)洗涤2次，重悬于5mL PBS中，进行显微计数。

原生质体融合：采用双灭活原生质体法。调节红曲霉和土曲霉原生质体浓度使其基本相同，分别取5mL原生质体置于30W紫外灯下，距离30cm照射3min灭活。照射后，将原生质体混合，混合液在2000g离心5min收集原生质体，加入1.5mL融合剂(30%PEG6000，用0.05mol/L CaCl₂配制，含0.05mol/L甘氨酸)，30℃保温15min，用PBS稀释至适当浓度，取0.1mL涂布在再生培养基上，30℃培养4—6d，筛选融合子。

1.4 发酵^[11]

将孢子接种于种子培养基中，30℃振荡(220r/min)培养48h后，以10%接种量接种到发酵培养基，30℃振荡(220r/min)培养9d。

1.5 Monacolin K 产量测定^[11]

取1.0mL发酵液，加4.0mL无水甲醇，振荡提取1h，3500r/min离心10—15min，取上清液进行HPLC测定 Monacolin K 的含量。HPLC检测条件如下：流动相为18mmol/L H₃PO₄-甲醇(22.5/77.5)；检测波长为237nm；进样量为10μL；柱温：35—40℃；层析柱：C-18反相柱；流速：1.0mL/min。

1.6 红曲色素测定^[12]

取1mL发酵液，加入3倍体积的95%的乙醇，30℃振荡提取1h，3500r/min离心10—15min，取上清液用分光光度计(UV-1000, Labtech Inc)测定在510nm和410nm的吸光值。

1.7 融合子的稳定性考查

将初筛产量提高的融合子在产孢培养基上连续传代5次，对每一代都进行摇瓶发酵，测定 Monacolin K 发酵产量和红曲色素色价。

2 结果

2.1 红曲霉和土曲霉原生质体制备和再生的最佳条件

为确定两株亲本菌株的原生质体形成与再生的最佳条件，从菌丝菌龄、酶解时间、酶解温度、混合酶比例4个方面研究了它们对原生质体形成的影响，并最终确定了适于红曲霉和土曲霉原生质体制备和再生的最佳条件，结果见表1。在实验确定的最佳条件下，两株亲本的菌丝体几乎都全部酶解成原生质体(图1)；再生率也处于较高水平，土曲霉和红曲霉的再生率分别为18.6%和11.9%。

表1 两株亲本原生质体形成与再生的最佳条件

菌株	菌龄/h	酶解温度/℃	酶解时间/h	混合酶比例	原生质体形成数/mL	再生率/%
CA99	24	34	5	0.5%溶壁酶+0.3%蜗牛酶+0.3%纤维素酶	1.76×10 ⁷	18.6
M-3	24	30	3.5	0.5%溶壁酶+0.3%蜗牛酶+0.3%纤维素酶	1.68×10 ⁷	11.9

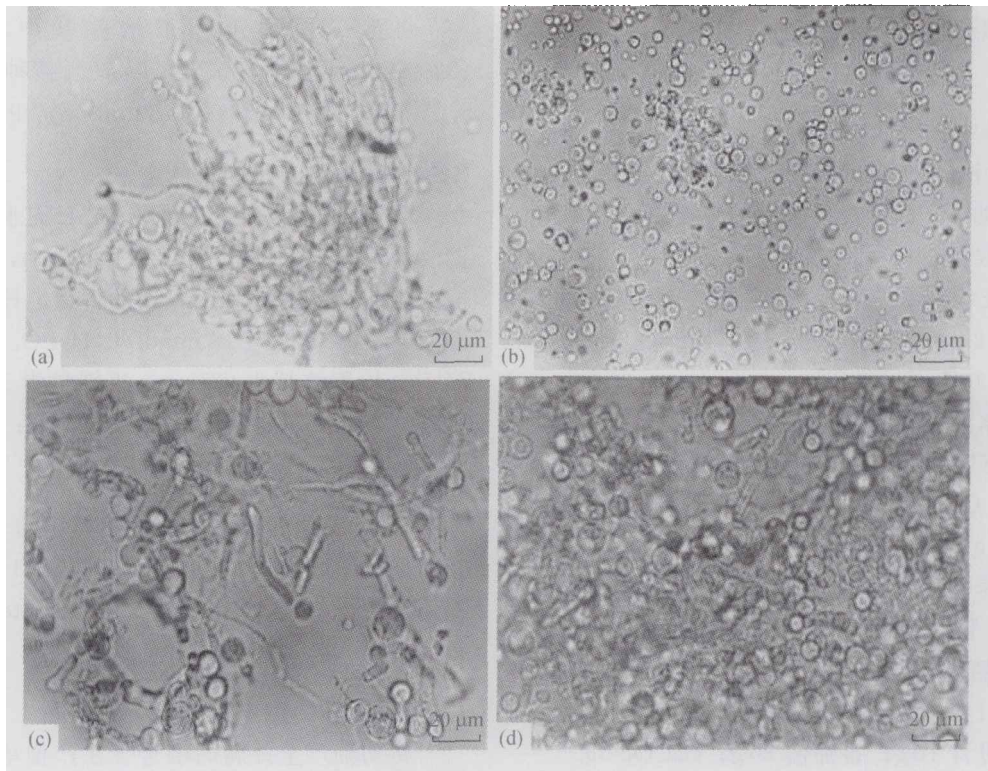


图1 原生质体形成的显微摄影

(a) 土曲霉经酶解 1 h; (b) 土曲霉经酶解 5 h; (c) 红曲霉经酶解 1 h; (d) 红曲霉经酶解 3.5 h

2.2 双灭活原生质体法融合

原生质体融合后如何筛选出具有目的性状的融合子一直是原生质体融合技术的关键和难点。营养缺陷型互补选择和抗性标记选择是较为经典的方法^[9,10]，这两种方法具有融合子检出准确，操作简单等优点。但是营养缺陷型突变株的和抗性突变株的获得较为繁琐，需要事先投入大量时间和工作量；而且亲本的一些优良性状可能丢失等。灭活原生质体法也是一种常用筛选方法^[13]，通过紫外线照射或热灭活原生质体，使其丧失在再生培养基上再生的能力，而只能作为遗传物质的供体，只有经融合后由于致死损伤部位的互补才可以形成具有再生能力的融合体。本研究采用双灭活原生质体法。将以上获得的原生质体在紫外线下分别照射 3 min，两株亲本的原生质体的致死率都达到 99.99% 以上(表 2)。将 5 mL 等浓度经紫外线灭活的红曲霉和土曲霉的原生质体进行混合，用 30% PEG 6000 和 50 mmol/L CaCl₂ 混合液处理，30℃ 作用 15 min，经 PBS 稀释至合适浓度，涂布于再生培养基，筛选

融合子。共挑取 363 个融合子单菌落。

表 2 两株亲本原生质体的紫外照射结果

紫外照射时间 / min	致死率 / %	
	<i>A. terreus</i> CA99	<i>M. anka</i> M-3
1	99.61	99.84
2	99.96	99.98
3	99.994	99.997

2.3 融合子的培养特征

土曲霉出发菌株在斜面培养基上呈土黄色、粉状、产生少量黄色色素；红曲霉出发菌株在斜面培养基上呈红色、绒毛状、产生大量红色色素。本研究主要挑取具有红曲霉性状的融合子，融合子在固体培养基上生长时，颜色呈橙色，介于两亲本菌株之间，菌落形状不规则，生长初期菌落表面为橙色，生长后期在菌落边缘菌丝呈白色，表面呈粉状，不易挑起，产生较多的红色色素(图 2)。

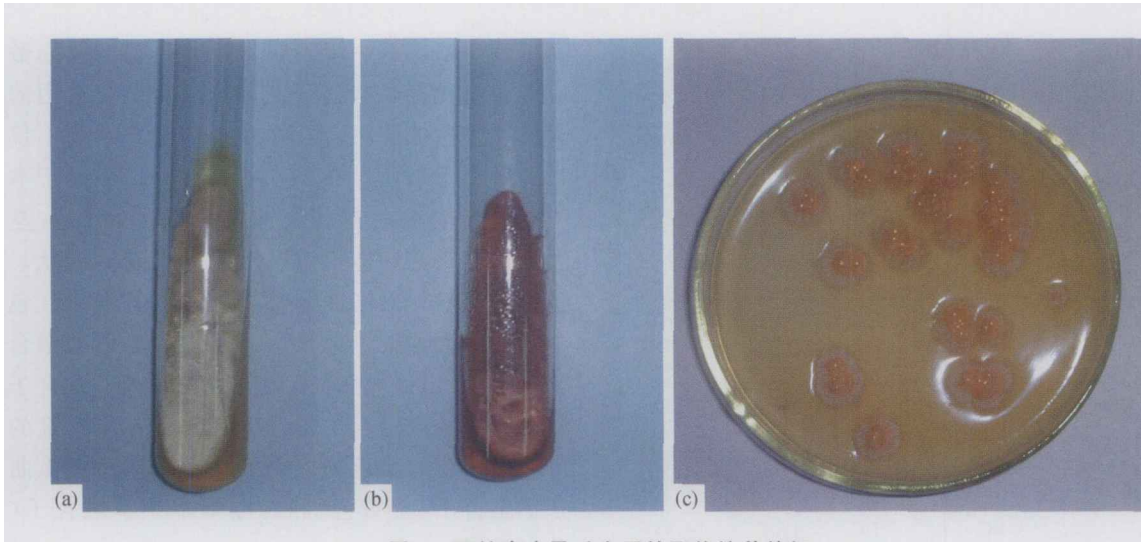


图2 两株亲本及融合子的固体培养特征

(a) 土曲霉 CA-99; (b) 红曲霉 M-3; (c) 融合子(为生长 72 h 时菌落, 后期在其表面可形成粉状的孢子)

在发酵培养基中, 土曲霉发酵液呈棕黄色, 红曲霉的发酵液呈红色, 不同融合子在发酵过程中产生的红色深浅程度不同(从浅红色到暗红色)(图 3)。不同融合子之间以及它们和出发菌株之间的发酵液颜色、菌丝成球情况和 Monacolin K 发酵产量有明显的区别, 主要有 3 大类: 发酵液呈暗红色、菌丝

成球不均匀、产量与出发菌株相比没有明显提高的融合子(可能为红曲霉的单亲本融合子); 发酵液呈橙红色、菌丝成球均匀、产量与出发菌株相比有明显提高的融合子; 发酵液呈浅红色、菌丝不成球、产量与出发菌株相比有所下降的融合子。

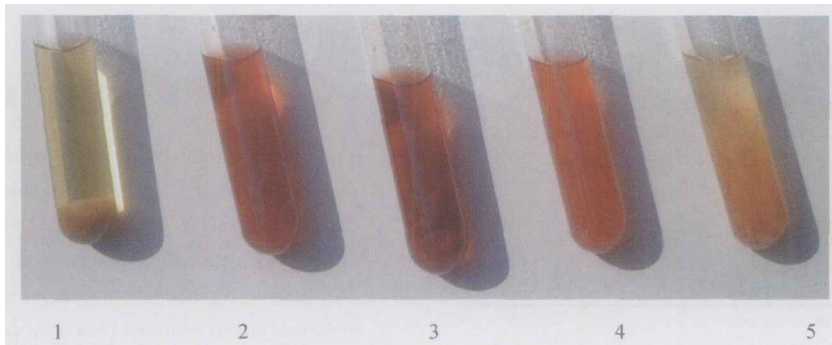


图3 两株亲本及融合子的发酵液经过甲醇萃取后的特征

1. 土曲霉 CA-99; 2. 红曲霉 M-3; 3—5. 不同融合子; 4 为 Monacolin K 产量提高的融合子

2.4 融合子的 Monacolin K 产量和红曲色价

实验中共挑取了 363 个融合子单菌落, 经过摇瓶初筛得到 105 株 Monacolin K 发酵产量超过出发菌株红曲霉 M-3 的融合子, 经过三次复筛和遗传稳定性实验后仍有 19 株的产量超过出发菌株的融合子, 其中有 10 株融合子的产量提高幅度大于 60%。其中 F49 和 F104 的产量提高将近一倍。结果如表 3。

对以上 10 株融合子的红色色素的色价进行了测定, 结果见表 3, 除 F122 之外, 其他融合子的红曲色价均低于 M-3 的色价。因此, F122 有可能应用于高含量 Monacolin K 红曲之生产。

此外, 通过对 F49 的发酵培养基中的碳源、氮源和无机盐等进行优化, 获得了适于此融合子发酵合成 Monacolin K 的发酵培养基(FM A), 该培养基组成为 10% 葡萄糖, 0.5% 牛肉膏, 0.25%

(NH₄)₂SO₄, 2% 番茄酱, 0.1% CaCO₃, 0.1% MgSO₄, pH 6.5. F49 在此培养基中的 Monacolin K 产量可以达到 1216 μg/mL, 而出发菌株 *M. anka* M-3 在此培养基的发酵单位为 796 μg/mL(表 4).

表 3 第三次复筛时融合子的 Monacolin K 产量和红曲色素色价

菌株	Monacolin K 产量 (μg · mL ⁻¹)	产率 / %	红曲色素色价	
			OD ₅₁₀	OD ₄₁₀
<i>M. anka</i> M-3	237	100	14.50	28.10
<i>A. terreus</i> CA99	910	384	0	0
F49	460	194	15.13	23.30
F104	457	193	13.25	14.93
F66	438	185	11.24	11.64
F126	434	183	7.41	8.79
F245	433	183	8.21	9.31
F270	412	174	8.82	10.03
F189	407	172	3.77	4.53
F122	386	163	16.50	30.88
F52	385	163	11.90	12.40
F202	383	162	9.64	10.00

表 4 红曲霉 M-3 和 F49 在优化发酵培养基和出发发酵培养基中的产量比较

菌株	Monacolin K 产量 / (μg · mL ⁻¹)	
	FM	FM A
<i>M. anka</i> M-3	237	796
F49	460	1216

3 讨论

为获得高产 Monacolin K 的红曲霉菌株, 将高产 Monacolin K 的土曲霉 *Aspergillus terreus* CA99 与低产 Monacolin K 的红曲霉 *Monascus anka* M-3 进行原生质体融合. 采用双灭活原生质体融合法共获得 363 株融合子, 并从中筛选得到 19 株产量高于出发菌株的高产融合子, 其中有 10 株 Monacolin K 产量的提高幅度超过 60%, 有 2 株的产量提高了将近一倍. 所获得的融合子仍具有产生红曲色素的能力. 虽然红曲霉和土曲霉之间的融合为属间融合, 但由此获得的红曲霉融合子的 Monacolin K 产量提

高了近一倍, 进一步表明了丝状真菌的属间融合有可能获得优良性状的杂交菌株. 本研究采用的是双灭活原生质体法融合, 在获得的融合子中不仅存在目的融合子, 还存在单亲本融合子. 但由于本研究所用的亲本土曲霉和红曲霉在培养特征上差异极大, 土曲霉在固体培养基上呈土黄色, 粉状, 产少量黄色色素; 而红曲霉在固体培养基上呈红色, 绒毛状, 产大量红色色素, 因此很容易根据融合子的色素特征将目的融合子与土曲霉单亲本融合子区分开来, 在挑取融合子进行 Monacolin K 产量的筛选时, 主要挑取颜色为橙色的融合子以避免土曲霉单亲本融合子(土黄色)和红曲霉单亲本融合子(暗红色)的干扰.

红曲霉由于其在食品方面的安全性及其可以产生 Monacolin K 和红曲色素以及其他生理活性物质, 除了被用于发酵生产红曲色素及 Monacolin K 以外, 也已被用于开发成食品添加剂用于制造保健食品及保健饮料, 如红曲醋, 红曲酒, 红曲肉制品等. 通过原生质体融合获得的红曲霉融合子的 Monacolin K 产量提高了一倍, 将更有利于其在功能性食品中的应用, 但将其应用于工业生产, 还需要大量的研究工作.

参 考 文 献

- 1 Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiot*, 1980, 33(30): 334—336
- 2 Alberts AW, Chen J, Kuron G, et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(7): 3957—3961
- 3 Endo A. Monacolin K—a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot*, 1979, 32(8): 852—854
- 4 路秀玲, 赵树欣, 宫慧梅. 红曲霉的应用研究现状与展望. *食品科技*, 2001, (1): 43—46
- 5 Hever D, Yip I, Ashley JM, et al. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69: 231—236
- 6 Rhyu M-R, Kim E-Y, Han J-S. Antihypertensive effect of the soybean paste fermented with the fungus *Monascus*. *Inter J Food Sci Tech*, 2002, 37: 585—588
- 7 Anne J, Peberdy JF. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J Gen Microbiol*, 1976, 92: 413—417

- 8 Ai Y, Meng F, Xu Y. Hybridization dominance of kinetics in recombinant ATH-1376 obtained via protoplast fusion between *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *Chin J Biotechnol.* 1997, 13(3): 161—167
- 9 Khattab AA, Bazaraa WA. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005, 32(7): 289—294
- 10 Kirimura K, Sato T, Nakanishi N, et al. Breeding of starch-utilizing and itaconic-acid-producing koji molds by interspecific protoplast fusion between *Aspergillus terreus* and *Aspergillus ussami*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997, 47: 127—131
- 11 蔡晶晶,李季伦. 土曲霉产生洛伐他汀的研究. *微生物学杂志*, 2000, 20(4): 1—4
- 12 Suh JH, Shin C S. Physiological analysis on novel coculture of *Monascus* sp. J101 with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, 190: 241—245
- 13 周东坡,平文祥,孙剑秋,等. 通过灭活原生质体融合选育啤酒酵母新菌株. *微生物学报*, 1999, 39(5): 454—460

含 S, N, O-杂环的难降解有毒有机污染物微生物降解机理和技术研究取得重要进展

在国家自然科学基金的连续资助下,山东大学微生物技术国家重点实验室许平教授及其合作者系统地研究了环境中含 S, N, O-杂环的有毒难降解有机污染物的微生物降解机理和技术.通过 5 年多的积累,在化石燃料生物脱有机硫、含 S, N, O-杂环的有毒难降解有机污染物的微生物降解和杂环联合降解的基因工程菌的构建等方面取得了系列重要成果.2005—2006 年在环境和环境微生物领域国际上最有影响的两大刊物 *Environ. Sci. Technol.* (ES&T)和 *Appl. Environ. Microbiol.* (A&EM)上连续发表论文 7 篇,并应邀在著名刊物 *Trends in Microbiol.* (TiM)上撰写含 S, N, O-杂环有毒有机污染物微生物降解的综述论文(Xu P, Yu B, Li FL, Cai XF, Ma CQ, *Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles*, *Trends Microbiol.* 2006, 14(9): 398—405).

孤对电子有毒难降解有机污染物(如化石燃料中的有机硫和有机氮、二噁英、农药、染料等)引起的环境污染已成为 21 世纪影响人类生存与健康的重大问题.用现有的化学和物理方法较难处理这类污染物,因此研究新的有效控制有毒难降解有机污染物的方法已成为国际上十分关注的重要课题.利用微生物技术降解这些有机污染物已成为最有应用潜力、研究最活跃的领域之一.许平教授及其合作者紧紧围绕含 S, N, O-杂环化合物难降解的关键科学难题,利用我国丰富的特殊微生物与基因资源,在充分认识有机污染物和微生物降解(途径)特性的基础上,系统地研究了微生物降解有毒有机污染物的机理和技术,为促进我国环境毒物微生物降解研究走在世界前沿做出了贡献.课题组在以下 3 个方面取得了一系列重要进展.

1. 含 S, N, O-杂环有毒难降解有机污染物的微生物降解机理.孤对电子杂环(S, N, O-杂环)有机污染物是一大类非常难处理的有机污染物.微生物在漫长的地质年代中进化出丰富的生物多样性,理论上任何环境中存在的有毒物都可以被微生物降解和转化.课题组在全国广泛收集了大量特殊微生物资源,从微生物代谢中间物化学检测和基因水平上深入研究了硫、氮、氧杂环降解的微生物代谢途径,提出了一条重要的硫专一性代谢补充途径(4SM 途径).在实验室实现了汽油、原油的微生物脱硫和有机氮降解技术,为石油炼制的清洁生产提供了一种新的途径.

2. 有机污染物(S, N-杂环)微生物降解和资源化.化石燃料中的有机硫、有机氮和烟草中的有机氮烟碱化合物含量最高可以超过 10%,这些化合物一方面是环境污染物(毒物),另一方面也是宝贵的资源.课题组研究了有机硫微生物降解代谢的高值中间体(硫杂环的表面活性剂)和尼古丁微生物代谢的高值羟基有机氮的微生物转化技术,为环境污染物废弃资源高值化提供了新的技术.(下转第 550 页)